

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
2. Juni 2005 (02.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/049635 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/002503

(22) Internationales Anmeldedatum:  
12. November 2004 (12.11.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 53 175.0 14. November 2003 (14.11.2003) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: VOLLMERS, Philip [DE/DE]; Seilerstrasse  
52, 97074 Würzburg (DE).

(74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Röntgenring 4, Postfach 63  
23, 97013 Würzburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CH, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY HAVING FAT-REDUCING EFFECT

(54) Bezeichnung: HUMANE MONOKLONALE ANTIKÖRPER MIT FETTSENKENDER WIRKUNG

(57) Abstract: The invention relates to a purified polypeptide whose amino acid sequence is substantially identical with the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3, whereby the polypeptide binds low density lipoproteins (LDL) and/or oxidized LDL (oxLDL), especially LDL cholesterol and/or oxidized LDL cholesterol (oxLDL cholesterol). The invention relates to the use of the polypeptide in combination with conventional adjuvants and/or carrier substances for producing a drug having fat-reducing effect and for producing drugs for treating renal diseases.

(57) Zusammenfassung: Aufgereinigtes Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:3, wobei das Polypeptid low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidiertes LDL (oxLDL), insbesondere LDL-Cholesterin und/oder oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin), bindet. Die Erfindung beinhaltet die Verwendung des Polypeptides in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fett senkender Wirkung sowie von Medikamenten zur Behandlung von Nierenerkrankungen.

WO 2005/049635 A2

### **Humaner monoklonaler Antikörper mit fetttsenkender Wirkung**

5 Die Erfindung betrifft ein aufgereinigtes Polypeptid (SAM-6.10) sowie dessen Verwendung in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fetttsenkender Wirkung sowie zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Nierenerkrankungen.

### **10 Hintergrund der Erfindung**

Bei einem an Überangebot an Cholesterin (Hyperlipoproteinämie) im Körper kommt es zur Verkalkung (arteriosklerotische Plaque) der Innenschichten der Gefäße und zu einer langsam fortschreitenden Verhärtung und Verdickung der Arterienwände. Im Extremfall droht  
15 ein Verschluss des Gefäßes oder beim Aufbrechen der Plaque Thrombusbildung. Die Arteriosklerose ist mit ihren Folgeerkrankungen (koronare Herzkrankheiten, Herzinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheiten, Schlaganfall) noch immer die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Weit über die Hälfte aller für die medizinische Betreuung zur Verfügung stehenden finanziellen Mittel werden schätzungsweise für die Folgen der Arteriosklerose ausgegeben.  
20 Um die Ursachen der Arteriosklerose zu klären, wurden verschiedene Theorien entwickelt, wobei die Lipidtheorie die meistbeachtete ist.

25

Allgemein lässt sich sagen: Je höher der LDL-Cholesteringehalt bzw. der Gehalt an oxidiertem LDL-Cholesterin im Blut, desto höher das Risiko, an einer Gefäßverkalkung beispielsweise mit der Folge eines Herzinfarktes zu erkranken. Übergewicht und Hypercholesterinämie

sind mit die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose.

### **Definitionen und Begriffe**

5       Fette, wie z. B. Cholesterin, sind weder in Wasser noch in Blutflüssigkeit löslich. Um sie trotzdem in einzelne Körperregionen transportieren zu können, werden die Fette, sobald sie sich im Blut befinden, an bestimmte Eiweißkörper (Proteine) gebunden. Diese Verbindungen aus Lipiden (Fetten) und Proteinen (Eiweißen) werden als Lipoproteine bezeichnet.

10

Die „Lipoproteine“ des Plasmas sind hochmolekulare wasserlösliche Komplexe, die aus Lipiden (Cholesterin, Triglyceride, Phospholipide) und Apolipoproteinen bestehen. Das cholesterinhaltige Lipoprotein LDL-Cholesterin verursacht Arteriosklerose und wird auch das "böse" Cholesterin genannt, wobei die oxidierte Form des LDL-Cholesterins für den Körper noch gefährlicher ist.

15

„Cholesterin“ wird im Körper ubiquitär synthetisiert und ist ein wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen. Im Gegensatz zu den ebenfalls endogen synthetisierten Triglyceriden und Phospholipiden kann der Sterolring des Cholesterinmoleküls nicht mehr abgebaut werden; Cholesterin wird in der Leber zu Gallensäure umgewandelt oder unverändert über die Galle in den Darm ausgeschieden.

20

25

Im Plasma liegt Cholesterin zu 25-40% als freies (unverestertes) Cholesterin und zu 60-75% mit ungesättigten Fettsäuren verestert vor. Beide Formen zusammen werden als Gesamtcholesterin bezeichnet. Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit wird Cholesterin im Plasma als Komplex mit Apolipoproteinen transportiert. Im Blut

30

werden etwa 70 Prozent des Gesamt-Cholesterins mit Hilfe von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) transportiert.

5 „Triglyceride“ sind Ester von Glycerin mit drei Fettsäureresten. Analog zum Cholesterin werden auch die Triglyceride im Plasma aufgrund ihrer schweren Löslichkeit an Apolipoproteine gebunden transportiert.

10 „Lipoproteine“ werden in der Leber oder im Darm synthetisiert und transportieren im Blut fettlösliche Substanzen wie das Cholesterin.

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrer Dichte, man unterscheidet die fünf Dichteklassen: Chylomikronen, very low density lipoproteines (VDL), low density lipoproteines (LDL) und high density lipoproteines (HDL). Die Chylomikronen, deren physiologische Konzentration im Nüchternserum im Gegensatz zu jenen der anderen Lipoproteine sehr gering ist, sind Transportvehikel für exogene Glyceride. Die physiologische Verteilung der anderen Lipoproteine ist wie folgt: VLDL 10 %, LDL 70 % und HDL 20 %. VLDL sind die Vorläufer der LDL und Vehikel für den Transport von endogenen Glyceriden. LDL entstehen durch die Hydrolyse der VLDL. LDL und HDL sind beides Regulatoren der zellulären Cholesterinhomöostase, wobei HDL außerdem die Lipolyse (Spaltung von Triglyceriden in Glycerin und die freien Fettsäuren) regulieren. LDL haben einen Durchmesser von ca. 20 nm. HDL sind die kleinsten (7-10 nm) und eiweißreichsten Lipoproteinen. Neben nativem LDL (LDL) ist im Blutserum auch oxidiertes LDL (oxLDL) nachweisbar. oxLDL interagiert mit endogenen Plasmaproteinen, insbesondere Glycoproteinen, durch spezifische Liganden und bildet oxLDL-Glykoprotein-Komplexe.

30

„Apolipoproteine“ sind ein Bestandteil der Lipoproteine und umgeben, zusammen mit polaren Lipiden, als eine Art äußere Schale den aus hydrophoben Lipiden aufgebauten Lipoprotein-Kern. Mit Ausnahme von LDL, welches nur Apoprotein B enthält, weisen die einzelnen Lipoproteinklassen mehrere strukturell verschiedene Apolipoproteinklassen auf.

### **Lipoprotein-Transport**

Cholesterin wird hauptsächlich durch die beiden Lipoproteinklassen LDL und HDL transportiert. LDL sind vor allem zuständig für den Cholesterintransport zu peripheren Zellen, die spezifische Rezeptoren für die LDL besitzen. Die HDL ermöglichen und beschleunigen den Abtransport von Cholesterin aus den extrahepatischen Zellen und Gefäßwänden und führen es der Leber zu.

15

### **Pathogenität**

Hinsichtlich der Pathogenität bei Lipidstoffwechselstörungen läßt sich allgemein sagen, dass LDL-Cholesterinerhöhungen in Verbindung mit HDL-Cholesterinverminderungen die ausgeprägteste Risikoerhöhung für Arteriosklerose darstellen. In der Pathogenese spielen LDL, deren Partikel wesentlich zur Bildung atherosklerotischer Plaques beitragen, und HDL daher eine gegensätzliche Rolle. Für die Beurteilung des Infarktrisikos sind die Quotienten aus Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin und insbesondere LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin entscheidend. (Auf die schützende Wirkung des HDL-Cholesterins weisen auch epidemiologische Studien (Framingham-Studie) hin.) Die Folgeerkrankungen der Arteriosklerose beinhalten neben der koronaren Herzkrankheit und peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten insbesondere Infarkte in Herz und Gehirn (Schlaganfall).

30

Vermutlich verursacht oxLDL genauso wie LDL arteriosklerotische Plaques, wobei für den Körper von oxLDL die größere Gefahr ausgeht.

- 5       Aber auch bei anderen Erkrankungen scheint oxLDL eine wichtige Rolle zu spielen. Bei Patienten mit chronischem Nierenversagen und Diabetes ist die Konzentration an oxLDL-Glykoprotein-Komplexen höher als bei gesunden Patienten.
- 10       LDL wird durch die Leber und durch Makrophagen aus dem Blutkreislauf entfernt. Makrophagen sind Zellen des Fremdkörperabwehrsystems, die zur Phagozytose größerer Partikel fähig sind.
- 15       Der „Scavenger-Pathway“ ist ein bekanntes Modell zur Erklärung der Aufnahme von Partikeln durch Zellen (Phagozytose). Die Aufnahme fester Partikel (Gewebestrümmern, Fremdkörpern, Bakterien oder LDL-Plaques) in das Zellinnere von Phagozyten mit nachfolgendem intrazellulären Abbau erfolgt durch Phagozytose. Die zu Phagozytose befähigten Zellen werden auch als Fresszellen bezeichnet und bestehen überwiegend aus Gewebsmakrophagen sowie aus mobilen
- 20       Blutmonozyten.
- 25       Bei der „Phagozytose“ kommt es nach Anlagerung der Partikel an die Zellmembranen der Phagozyten durch Bindung an membranständige Fc- und Komplementrezeptoren zur Aktivierung kontraktile Strukturen innerhalb des Zytoplasmas. Durch lokale Einstülpungen der Zellmembranen kommt es zum Einschluss der Partikel in Zytoplasmavakuolen.
- 30       Die sog. Abräum-(Scavenger-)Phagozyten findet man im Lymphknoten in und entlang der zur Medulla (Mark) gehörenden Faserstränge.

Während der Lymphpassage vom afferenten zum efferenten Ende des Lymphknotens werden partikuläre Antigene durch die zur Phagozytose befähigten Zellen entfernt.

5           Darüberhinaus ist bekannt, dass die Adhärenz an phagozytierende Zellen, wie polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen, durch die Anhaftung von Immunoglobulinen (Ig) an die Oberfläche von Bakterien (und anderen Antigenen) vergrößert ist. Es wird vermutet, dass die gesteigerte Adhärenz durch Anlagerung des Fc-Anteils des Immunoglobulins an die Fc-Rezeptoren der Phagozyten bewirkt wird.  
10           Nach dem „Schmackhaftmachen der Antigene durch Anhaftung von (od Bindung von) Antikörpern“ wird der Komplex aus Antigen und Antikörpern von den phagozytierenden Zellen schneller aufgenommen und verdaut. Die Beschichtung der Antikörperoberfläche mit  
15           Immunoglobulinen wird auch als opsonin-bedingte (Fc) Adhärenz bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr.

Die an die Oberfläche von Bakterienzellen bindenden Antikörper sind in der Lage, bestimmte Komponenten der extrazellulären Flüssigkeiten zu fixieren. Im Überbegriff werden diese Komponenten als „Komplement“ bezeichnet. Tierversuche zeigten, dass die Phagozytose von mit Antikörpern beschichteten Zellen bei jenen Tieren mit Komplementmangel verzögert ist. Somit liegt nahe, dass es bei der Opsonierung einen Synergismus zwischen Antikörpern und Komplement gibt.  
20  
25

**Beschreibung der Erfindung**

Die Wirkung der aus dem Stand der Technik bekannten Arzneimittel zur Senkung des LDL-Cholesterins beruht auf der Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese (CSE). Als Cholesterinsynthesehemmer ist beispielsweise eine unter dem Handelsnamen Lipobay vermarktet Substanz bekannt geworden. Die Nebenwirkungen der CSE-Hemmer allgemein sind erheblich und schließen u.a. gastrointestinale Störungen, Schlafstörungen, Schwindel, Sehstörungen, allergische Reaktionen und Haarausfall ein. Lediglich Im Versuchsstadium, und zwar nur bei schwerer familiärer Hypercholesterinämie, ist ein Ansatz der somatischen Gentherapie, der die Übertragung des Gens für den LDL-Rezeptor auf autologe Leberzellen zum Inhalt hat.

Ein weitgehend nebenwirkungsfreier Stoff, der als Fettsenker wirkt, ist bislang nicht auf dem Markt. Insbesondere sind Antikörper, die eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von Lipoproteinen induzieren, bislang nicht bekannt. Obwohl die schädigende Rolle von Lipoproteinen bei Nierenerkrankungen (Lipid-induzierte Schädigung von Zellen des Glomerulus-Filtrations-Apparates der Niere) bekannt ist, gibt es noch keinen auf Antikörper basierenden Therapie-Ansatz von Nieren Erkrankungen, insbesondere der Glomerulonekrose.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Generierung eines neuen Stoffes bzw. einer neuen Stoffklasse zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verringerung des LDL-Cholesterins bzw. des oxLDL-Cholesterins bei Mensch und Tier mit dem vorteilhaften Ziel der Verringerung des Infarktrisikos.



Zur Lösung der Aufgabe wird ein Polypeptid vorgeschlagen, dessen

- dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3, und
- das low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidiertes LDL (oxLDL), insbesondere LDL-Cholesterin und/oder oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin), bindet.

Der Kern der Erfindung besteht in der überraschend gemachten Beobachtung, dass ein gereinigtes Polypeptid, dessen Sequenz ganz oder teilweise der leichten ( $V_L$ ) oder schweren Kette ( $V_H$ ) eines humanen monoklonalen Antikörpers (SAM-6.10) entspricht, die Senkung des low density lipoproteins (LDL) und/oder oxLDLs bewirkt. Die Entdeckung dieser Eigenschaft, die den Einsatz des Polypeptids in entsprechender pharmazeutischer Formulierung als Fettsenker nahelegt, wurde im Rahmen der biochemischen Charakterisierung des Polypeptids gemacht. Vorteilhafterweise ist die Bindung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder der Fragmente des Polypeptids an LDL und/oder oxLDL und an VLDL, den Vorläufern der LDL, stärker ist als die Bindung an HDL. Aufgrund dieser Eigenschaft führt das erfindungsgemäße Polypeptid zu einem geringen Wert für den jeweiligen Quotienten aus LDL/HDL und/oder oxLDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

Die spezifische Bindung des Polypeptides an low density lipoproteins (LDL und/oder oxLDL), bzw. LDL-Cholesterin und/oder oxLDL-Cholesterin wurde experimentell durch die ELISA-Methode nachgewiesen. Im gleichen Experiment konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung des erfindungsgemäßen Stoffes an high density lipoproteins (HDL) schwach ist.

- Der erfindungsgemäße Antikörper umfasst die nach der gängigen Nomenklatur zur Beschreibung von Antikörper bezeichneten Gruppen  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $F_v$ ,  $F_c$ ,  $Fab$ ,  $Fab'$ ,  $F(ab')_2$ . Die genannten Gruppen werden auch als Fragmente bezeichnet. Es ist durchaus möglich, dass
- 5 ein einzelnes Fragment Ursache für die fetttsenkende Wirkung des erfindungsgemäßen Polypeptids ist. In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Stoffes handelt es sich um einen human monoklonalen Antikörper.
- 10 Als „funktionelles Fragment“ im Sinne der Erfindung wird ein Polypeptid bezeichnet, dass zumindest eine der biologischen Aktivitäten besitzt, die auch das gesamte Polypeptid aufweist. Bei Antikörpern ist z. B. bekannt, dass für die spezifische Bindung nicht alle CDR-Regionen erforderlich sind. D.h. die spezifische Bindung des Antikörpers
- 15 kann z. B. durch nur eine CD-Region bewerkstelligt werden, obwohl insgesamt 3 CD-Regionen vorhanden sind. Die spezifische Bindung des Antikörpers an ein Antigen kann z.B. zur Induktion von Apoptose oder zur Inhibition der Zellproliferation führen. Die biologische Aktivität eines funktionellen Fragmentes kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Methoden, gemessen werden. Eine
- 20 Methode zur Messung der Interaktion zwischen Antikörpern und LDL, insbesondere LDL-Cholesterin, ist die ELISA-Methode.
- 25 Die complementarity-determining regions (CDRs) der Polypeptidsequenz beinhaltet die Aminosäuresequenz, die im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1), Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) und Gln-Ala-TrpAsp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) der SEQ ID NO 1 der variablen Region der leichten Kette ( $V_L$ ); siehe auch Figur 2.
- 30

Die complementarity-determining regions (CDRs) der Peptidsequenz beinhalten Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen identisch sind mit Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1), Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) und Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) der SEQ ID NO 3 der variablen Region leichten Kette (V<sub>H</sub>); siehe auch Figur 4.

Als „im wesentlichen identisch“ wird ein Polypeptid oder eine Nukleinsäuresequenz bezeichnet, die zumindest 75 %, 80 %, 85 %, oder 90 % mit der als Referenz angegebenen Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 1 und 3) oder mit der Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NO: 2 und 4) aufweist. In einer Weiterbildung des Polypeptids bzw. der Nukleinsäuresequenz sind mindestens 95 %, 98 %, 99 % oder 100 % Identität im Vergleich zu den angegebenen Referenzen nachweisbar. Für Polypeptide wird die Länge des Vergleichsabschnitts im allgemeinen mindestens 5, 10, 15 oder wünschenswerterweise mindestens 20 oder 25 aufeinander folgende Aminosäuren aufweisen.

Das erfindungsgemäße Polypeptid ist generierbar durch ein Verfahren, das unter dem Namen Hypridoma-Technik (Köhler, Millstein, Nature, 1975, Vol. 256, 495) bekannt ist und die Isolation von monoklonalen Antikörpern ermöglicht. Es beruht auf der in vitro Gewinnung von zellulären Hybriden die durch Zellfusion von normalen Lymphozyten mit unbegrenzt lebens- und teilungsfähigen Myelomzellen (z.B. HAB-1) gewonnen werden. Die hierbei erzeugten Hybridom-Zellen weisen Eigenschaften beider Elternzellen auf. Dem entsprechend besitzen sie die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper zu produzieren (z.B. SAM-6.10) und die Fähigkeit der Myelomzelle zur unbegrenzten Teilung und damit zur Produktion der Antikörper in großen Mengen. Jede aus der Fusion resultierende Hybridzelle stellt monoklonale Antikörper her deren Spezifität von der ursprünglichen

5 Lymphozytenzelle bestimmt wird. Die Hybridomzellen werden vermehrt und dann diejenigen selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Kultivierung dieser Auswahl und deren Isolierung führt zu hochspezifisch reagierenden Antikörpern, welche nur mit einer bestimmten antigenen Determinante reagieren.

10 Der Nachweis der deutlichen Senkung des low density lipoprotein (LDL)-Spiegels (bzw. des LDL-Cholesterin Spiegels) bzw. der jeweils oxidierten Form im Blutplasma wurde im Tierexperiment bestätigt, ohne dass sich der HDL-Spiegel im nachweisbaren Bereich senkt. Wesentlich dabei ist, dass die Vitalfunktionen der Tiere während der Gabe des Antikörpers nicht beeinträchtigt werden, so dass die erfindungsgemäße Substanz bislang als Nebenwirkungsfrei bezeichnet werden kann. (Die Wirkungsweise des erfindungsgemäßen Antikörpers könnte sich in Analogie zum Mechanismus des bekannten Scavenger-Pathways erklären lassen.)

20 Eine weiteres Indikationsgebiet für den Einsatz des erfindungsgemäßen Medikamentes ist die Behandlung von Nierenerkrankungen, insbesondere die Glomerulonekrose (Glomerulosklerose).

25 Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass das erfindungsgemäße Polypeptid zur Herstellung des Arzneimittels bevorzugt in gereinigter Form eingesetzt wird, wobei zur Reinigung sämtliche dem Fachmann bekannten Verfahren (z.B. Affinitätschromatographie, Gelfiltration) in Frage kommen. Als Indikation des erfindungsgemäßen Stoffes steht des fettsenkende Wirkung im Vordergrund, wobei insbesondere die selektive Senkung von LDL bzw. LDL-Cholesterin hervorzuheben ist.

30 Aufgrund der Eigenschaft LDL und/oder oxLDL stärker zu binden als HDL bewirkt das erfindungsgemäße Polypeptid einen geringen Wert

für den Quotienten aus LDL/HDL und/oder oxLDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

5 Die Hilfs- und Trägerstoffe zur Herstellung eines Arzneimittels sind dem Fachmann bekannt und können nach gängiger Praxis hergestellt werden (siehe Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

10

## Material und Methoden

### Immortalisierung von Lymphozyten und Primärtestung der Antikörper

5 Zur Immortalisierung werden die Lymphozyten mit dem Heteromyelom HAB-1 (Faller et al., 1990) nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert. Kurz zusammengefasst, Lymphozyten werden mit HAB-1 Zellen mittels PEG verschmolzen. Die Triome werden auf vier 24-Lochplatten ausgesät. Die durchschnittliche Wachstumsfrequenz beträgt 80-90%, 50% der wachsenden Klone sezernieren Immunglobuline. Die erste Austestung der sezernierten humanen monoklonalen Antikörper erfolgt im ELISA, um den Isotyp zu ermitteln. Nachfolgend können die humanen monoklonalen Antikörper immunhistochemisch, genetisch, biochemisch und molekularbiologisch analysiert werden.

#### Benötigte Medien:

- RPMI 1640 (Firma PAA) ohne Zusätze
- RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (HAT-Supplement, Firma PAA) sowie 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin
- HAB-1 (Fusionspartner) zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen
- zentrifugieren 5 min bei 1500U/min
- eingefrorene Lymphozyten (aus Milz, Lymphknoten oder Blut) auftauen und zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen, ebenfalls zentrifugieren
- beide Pellets jeweils in 10 ml RPMI ohne Zusatz aufnehmen und in der Neubauer-Zählkammer zählen
- im Verhältnis von 1:2 – 1:3, Hab-1 zu Lymphozyten, fusionieren
- die Zellpellets nach dem zweiten Waschvorgang zusammen geben, mischen und 8 min bei 1500 U/Min zentrifugieren
- das zuvor bei 37°C aufgewärmte PEG (Polyethylene Glycol 1500, Firma Roche) vorsichtig tröpfelweise auf das Pellet unter leicht rotierenden Bewegungen des 50 ml Röhrchens laufen lassen
- leicht resuspendieren und dann genau 90 sek. im Wasserbad bei 37°C rotieren lassen
- danach wird das PEG mit RPMI ohne Zusätze herausausgewaschen (zwei volle 10er Pipetten)

- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- 24 Well-Platten ausplattieren mit 1ml pro Well RPMI mit HAT-Zusatz (HAT= Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)
- das Pellet lösen in RPMI mit HAT-Zusatz
- 5 • jeweils einen halben ml der Zellen in ein 24 Well pipettieren
- Fusionsplatten in den Brutschrank stellen
- wöchentlich Mediumwechsel mit RPMI mit HAT-Zusatz

#### **Reinigung des Antikörpers SAM-6.10**

- 10 Reinigung von Kulturüberstand durch Kationenaustauschchromatographie über FPLC

- 15 Die den IgM-Antikörper SAM-6.10 produzierenden Hybridomzellen wurden hierzu in einem speziellen serumfreien Zellkulturmedium (AIMV-Medium, Gibco) herangezogen und der Gehalt an IgM im Kulturüberstand nephelometrisch bestimmt. Zur Aufreinigung wurde der Kulturüberstand auf einen pH-Wert von auf 5,9 eingestellt und die Lösung filtriert. Zur Bindung wurde eine spezielle Kationen-Säule (HiTrap™ SP FF column, 5 ml, Amersham Bioscience) verwendet.
- 20 Die Säule wurde zu Beginn der Reinigung mit filtriertem Puffer A (20 mM Phosphatpuffer, pH 5,9) äquillbriert. Anschließend wurde der auf Eis gekühlte Kulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde die Säule für 20 min und einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer A bis zu
- 25 einer Basislinienkonstanz gewaschen um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde der an die Säule gebundenen Antikörper durch Beimischung von Puffer B (20 mM Phosphatpuffer, 1M NaCl, pH 8,0) eluiert und in Fraktionen gesammelt. Der Gehalt an SAM-6.10 Antikörper (IgM) in den einzelnen Fraktionen
- 30 wurde im Folgenden nephelometrisch bestimmt und die Reinheit und Intaktheit des gereinigten Antikörpers über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse überprüft.

### **Messung von oxLDL**

Die Messung erfolgt mit Hilfe des Test-Kits Oxidised LDL ELISA von der Firma Mercodia, Uppsala, Schweden. Test-Prinzip: Der ELISA für oxidiertes LDL ist ein enzymatischer, zweiseitiger Immunoassay mit einer Festphase. Er basiert auf der direkten Sandwich-Technik, bei der zwei monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen auf oxidiertem Apolipoprotein B ausgerichtet werden. Während der Inkubation reagiert oxidiertes LDL in der Probe mit anti-oxidiertem LDL-Antikörpern, die an die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte gebunden sind. Nach dem Waschen, wobei die nicht-reaktiven Bestandteile der Probe entfernt werden, erkennt ein peroxidase-konjugierter anti-human Apolipoprotein B Antikörper das an der festen Phase gebundene oxidierte LDL. Nach einer zweiten Inkubation und einem Waschvorgang, der die mit dem ungebundenen Enzym markierten Antikörper entfernt, wird das Konjugat durch Reaktion mit 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Säure gestoppt, um einen kolorimetrischen Endpunkt zu definieren der bei 450 nm spektrophotometrisch abgelesen wird.

20

### **Messung der Bindung von SAM-6 an oxLDL**

Eine ELISA-Platte (Becton Dickinson Labware Europ, Frankreich) wurde mit den unterschiedlich stark oxidierten LDL Fraktionen über Nacht bei 4°C inkubiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit RPMI-1640 Medium welches mit 10% FCS versetzt wurde für 1h geblockt. Anschließend wurde die Platte mit 60µg/ml SAM-6 Antikörper für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die ELISA-Platte für 1 h mit HRP-gekoppeltem Zweitantikörper (rabbit anti human IgM, Dako, Hamburg, Deutschland, 1:1000 in PBS) inkubiert. Danach wurde die Platte nochmals mit PBS und Citratpuffer gewaschen, mit OPD (DakoCytomation, Glostrup,

25

30



Dänemark) versetzt und der Farbumschlag bei 490 nm mit einem ELISA-reader gemessen.

#### **Durchflusszytometrie (FACS Analyse)**

5 Die verwendeten adhärennten Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Reaktion wurde mit 10 ml RPMI-1640 Medium (+ Supplemente) abgestoppt und die Zellen mit 1000 x g für 5 min pelletiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in FACS-Puffer (PBS, 0,01% Na-Azid)

10 aufgenommen und zur Rekonstitution der Zellmembranen für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und je 200 µl der Zellsuspensionen in FACS-Reaktionsgefäße überführt, sodass pro Röhrchen eine Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen vorlag. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C

15 und 1400 rpm pelletiert, die Pellets resuspendiert und mit den Primär-Antikörpern für 15 min auf Eis inkubiert. Als Primär-Antikörper wurden 100 µg/ml SAM-6 Antikörper in FACS-Puffer (Gesamtvolumen 200 µl) bzw. 100mg/ml LDL verwendet. Als Isotyp-Kontrolle fungierten 100 µg/ml Chrompure human IgM. Alternativ wurden die Zellen mit LDL für 30 min vorinkubiert und anschließend für 15 min

20 100µg/ml SAM-6 Antikörper zugesetzt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen.

25 Danach erfolgte eine 15minütige lichtgeschützte Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Rabbit anti human IgM, FITC-gekoppelt, 1:50 in FACS-Puffer für SAM-6 bzw. Chrompure human IgM). Nach einem erneuten Waschgang wurden die Zellen in 200 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte mittels eines

30 Durchflußzytometers (FACScan; Becton Dickinson, USA).

### **Tierexperimente zum Nachweis der *in-vivo* Wirkung des Antikörpers SAM-6.10**

5       **Experiment 1:** 500µg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intraperitoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 2 Tagen gemessen (Methode siehe unten).

**Experiment 2:** wie oben

10       **Experiment 3:** 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intraperitoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 14 Tagen gemessen.

15               Kontrolle A: Normalwerte Kontrollmaus  
              Kontrolle B: Normalwerte Kontrollmaus

Die Serumkonzentration von LDL ist bei den mit SAM-6.10 behandelten Mäusen deutlich reduziert (siehe Figur 10 und 11).

### 20       **Toxizität**

500µg bzw. 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurde Mäusen intraperitoneal injiziert.

- keine akute Toxizität
- keine latente Toxizität (Zeitraum 3 Monate).

25       Die Organe der getöteten Mäuse aus Experiment 1, 2 und 3 (siehe oben) wurden entnommen und untersucht: Leber, Lunge, Herz, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Nieren, Magen und Gehirn wiesen keine morphologischen Veränderungen auf. Darüber hinaus wurden die Organe  
30       immunhistochemisch auf eventuelle Lipideinlagerungen unter-

sucht. Die Färbung mit Sudan III zeigte in keinem Organ eine Einlagerung von Lipiden.

5 Die Organe der getöteten Mäuse wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff Sudan III nach folgendem Protokoll:

#### 10 **Sudan III-Färbung auf Paraffinschnitten/ auf Makrophagen**

##### Entparaffinierung:

- Xylol 1 5 min
- Xylol 2 5 min
- 100% Ethanol 1 5 min
- 15 • 100% Ethanol 2 5 min
- Methanol 70ml  
+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500µl 5 min
- 90% Ethanol 1 3 min
- 90% Ethanol 2 3 min
- 20 • 80% Ethanol 1 3 min
- 80% Ethanol 2 3min
- 70% Ethanol 1 3 min
- 70% Ethanol 2 3 min
- 25 • Schnitte in PBS stellen
- Schnitte 15 min mit Sudan III inkubieren
- waschen mit Aqua dest.
- 1 x in 60% Isopropanol eintauchen
- waschen mit Aqua dest.
- 30 • Gegenfärbung mit Hämalaun für 6 min
- Schnitte 10 min wässern, waschen mit Aqua dest und mit Glycerin-gelatine eindecken

35 Für die Sudan III Färbung von Makrophagen werden die adherenten Makrophagen auf Objektträgern angezüchtet und dann mit den entsprechenden Agenzien behandelt. Die Färbung wird wie folgt durchgeführt:

- Fixierung der Zellen in 60% Isopropanol (6 min)

- 20 min mit Sudan III inkubieren
- waschen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 6 min
- Schnitte 10 min wässern, waschen mit Aqua dest und mit Glyce-  
ringelatine eindeckeln

### **Bestimmung von Lipiden in Blutproben**

Die Messung der verschiedenen Lipide im Blutserum wurde automa-  
tisch mit dem MODULAR D P800 Gerät (Roche) vorgenommen.

- 10 Die Bestimmung des LDL-Cholesterinwertes erfolgte durch eine en-  
zymatische, kolorimetrische Methode (CHOD/PAP) ohne Probenvor-  
behandlung.

### **Testprinzip zur Bestimmung der Lipidkonzentration im Serum:**

- 15 HDL, VLDL und Chylomikronen werden von einem Detergenz 1 spe-  
zifisch hydrolysiert. Das in diesen Lipoproteinen freigesetzte Choles-  
terin reagiert sofort durch die enzymatische Wirkung der Cholesteri-  
nesterase (CE) und Cholesterinoxidase (CHOD) und es entsteht  
20 Wasserstoffperoxid. Dies bildet mit 4-Aminoantipyridin in Anwesen-  
heit einer Peroxidase (POD) ein farbloses Produkt. Während dieses  
Schrittes bleiben die LDL-Partikel intakt. Die Reaktion von LDL-  
Cholesterin wird durch Zugabe von Detergenz 2 und der Kupplungs-  
substanz N,N-bis(4-Sulfobutyl)-m-toluidin (DSBmT) ausgelöst. Das  
25 zweite Detergenz setzt Cholesterin in den LDL-Partikeln frei. In der  
enzymatischen Reaktion wird in Anwesenheit der Kupplungssub-  
stanz ein Farbstoff gebildet. Die Intensität des gebildeten roten Chi-  
noniminfarbstoffs ist direkt proportional zur LDL-Cholesterin-  
Konzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei  
30 552 nm bestimmt.

**ELISA (LDL/HDL)**

- ELISA-Platte vorbeschichten mit LDL (Lipoprotein Low Density from Human Plasma, Firma Sigma, 10µg/ml in PBS) oder HDL (Human HDL, Firma Chemicon, 10µg/ml in PBS) → 50 µl pro well
- 5 - Platte abdecken und über Nacht bei 4°C lagern
- am nächsten Tag Platte 2 x mit PBS waschen
- 100 µl RPMI in jedes well pipettieren. und für 1h bei RT inkubieren
- danach 2 x mit PBS waschen
- 10 - 50 µl der jeweiligen Positivkontrollen in je 2 wells pipettieren (Doppelbestimmung)  
Positivkontrolle: Mab to human LDL Mouse IgG2a 1:1000 in PBS
- daneben 50 µl RPMI als Negativkontrolle (Doppelbestimmung)
- 50 µl der Proben (Überstand SAM6.10) (Doppelbestimmung) nebeneinander pipettieren
- 15 - 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 20 - 50 µl der jeweiligen 2. AK (Peroxidase konjugiert.) pipettieren: rabbit anti human IgM 1:1000 in PBS/0,05% Tween (für SAM-6.10)  
rabbit anti Mouse IgGs 1:1000 mit PBS Tween (für Positivkontrolle LDL)
- 25 - 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 1 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit Citratpuffer waschen
- 30 - zum Auswerten: OPD Tablette (Dako, Hamburg) in Citratpuffer lösen + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 ml Citratpuffer + eine Tabl. + 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- 50 µl Farbstoff in jedes Well pipettieren
- bei positiver Reaktion (gelbe Färbung) mit 10 µl 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppen
- 35

## Erläuterung der Figuren

### Sequence listing

5      Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 1) der variablen Region der leichten Kette ( $V_L$ ).

10      Figur 2 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 2) der variablen Region der leichten Kette ( $V_L$ ). Die complementarity-determining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) von SEQ ID NO 2.

15      Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 3) der variablen Region der schweren Kette ( $V_H$ ).

20      Figur 4 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 4) der variablen Region der schweren Kette ( $V_H$ ). Die complementarity-determining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) und 295-330 (CDR3) von SEQ ID NO 4.

### Zellbiologische Experimente

25      Die nachfolgende erklärten Figuren sollen die Erfindung nicht einschränken, sondern nur erläutern und deren Ausführbarkeit beispielhaft belegen.

30      Figur 5 zeigt die Messung von oxLDL in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit einer Kupfersulfatlösung. Im Versuch wurde LDL (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurde für 3 bzw. 15h mittels Inkubation mit 20  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  oxidiert. Mit dem Mercodia Oxidised LDL ELISA wurde, der Gebrauchsanweisung folgend, die Menge an oxi-

diertem LDL bestimmt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Menge an oxidiertem LDL mit steigender Inkubationsdauer zunimmt, wobei auch jene LDL Fraktion, welche nicht mit Kupferionen behandelt wurde, zum Teil schon in oxidiert Form vorliegt. Nach 15 stündiger Inkubation ist der Anteil an oxidiertem LDL etwa verdoppelt.

Figur 6 zeigt den Nachweis der Bindung von SAM-6 an oxLDL.

Für den Nachweis der Bindung von SAM-6 an oxLDL mittels ELISA Bindungsassay wurden die ELISA Platte mit unterschiedlich stark oxidierten LDL Fraktionen vorbeschichtet, bevor der Erstantikörper SAM-6 und der zu Detektionszwecken erforderliche Zweitantikörper anti-human IgM hinzugegeben wurde. Das Ergebnis zeigt, dass je mehr LDL in seiner oxidierten Form vorliegt, desto stärker bindet der erfindungsgemäße Antikörper SAM-6.

Figur 7 zeigt das Ergebnis einer FACS Analyse. Bei den dafür verwendeten Zellen handelt es sich um Zellen der Maus-Makrophagen Zelllinie P388D1(IL-1) (DSMZ Accession No. ACC 288). Figur 7A zeigt die Bindung von LDL an Macrophagen. Figur 7B belegt, dass auch der humane monoklonale Antikörper SAM-6 an Macrophagen bindet. Mit dem Nachweis der Bindung eines Kontroll IgM an Macrophagen in Figur 7C wird gezeigt, dass die Macrophagen  $\mu$ -Rezeptoren besitzen. Mit der Rechtsverschiebung des Signals in Figur 7D wird gezeigt, dass eine gleichzeitige Inkubation von LDL und SAM-6 eine vermehrte Bindung von SAM-6 an die Zellen bewirkt.

Die Figuren 8 und 9 zeigt das Ergebnis der Sudan III Färbung für die Zellen der Maus-Makrophagen Zelllinie P388D1(IL-1) verwendet wurden.

In Figur 8 sind Zellen gezeigt, die für 48h entweder mit SAM-6 oder einem IgM Kontrollantikörper inkubiert und anschließend einer Sudan III Färbung unterzogen wurden. Die mit dem Antikörper SAM-6 inkubierten Zellen zeigen aufgrund der Rotfärbung eine deutliche Einlagerung von Neutralfetten. Die mit dem Kontroll-Antikörper inkubierten Zellen zeigen dagegen keine Veränderungen.

Für die in Figur 9 zeigten Färbungen wurden die Makrophagen für 24h sowohl mit als auch ohne Zusatz von FCS kultiviert. Danach wurde für weitere 24h entweder nur LDL oder nur SAM-6 beziehungsweise LDL und SAM-6 gemeinsam zugesetzt. Anschließend wurde eine Sudan III Färbung durchgeführt. Die linke Bildspalte mit den Figuren 9A, 9C und 9E zeigen Zellen, die ohne den Zusatz von FCS kultiviert wurden. Die rechte Bildspalte mit den Figuren 9B, 9D und 9F zeigen Zellen, die mit Zusatz von FCS kultiviert wurden.

Die Figuren 9A und 9B belegen, dass sowohl Makrophagen, die ohne FCS kultiviert wurden, als auch Macrophagen, die in Anwesenheit von FCS gewachsen sind, eine basale Einlagerung von Neutralfetten zeigen. Die Figur 9C belegt, dass bei Zugabe von SAM-6 zu Makrophagen, die ohne FCS kultiviert wurden, keine Fett-Einlagerung nachweisbar ist. Dagegen wird, wie in Figur 9D gezeigt, eine verstärkte Lipid-Akkumulation bei Makrophagen beobachtet, die mit FCS kultiviert wurden und denen anschliessend SAM-6 zugesetzt wurde. Die Figuren 9E und 9F zeigen, dass bei einer Co-Inkubation von SAM-6 und LDL die intrazelluläre Lipid-Akkumulation sowohl bei Makrophagen, die mit FCS kultiviert wurden als auch bei denen die ohne Zusatz von FCS gewachsen sind, deutlich zu nimmt.

Figur 10 zeigt den Einfluss des Antikörpers SAM-6 auf LDL Werte *in vivo*. Im Versuch wurde den Mäusen 1mg gereinigter SAM-6 Antikör-



per bzw. im Kontrollexperiment 1mg human Chrompure IgM (Isotyp-Kontrolle) i.p. injiziert. Die LDL Konzentration im Blut wurde nach 24 und 48h gemessen. Dabei kann nach 24 und 48h Stunden bei SAM-6 behandelten Mäusen eine deutliche Reduktion von Serum LDL beobachtet werden.

Die Messung von LDL im Blutserum wurde automatisch mit dem MODULAR D P800 Gerät (Roche) vorgenommen, wobei sich die aufgetragenen Werte als Ergebnis des Diagnostik Kits „LDL-Cholesterol Direct“ (Firma Roche Diagnostiks) ergeben.

Figur 11 weist ebenfalls die *in vivo* Wirkung von SAM-6.10 nach, wobei zur Errechnung der Werte eine indirekte Methode nach der Friedewald-Formel angewandt wurde. Dabei errechnet sich die Menge an LDL aus der Differenz von Gesamtcholesterin, HDL und Triglyceriden. Gemäß dieser Art der Versuchsauswertung wäre die Reduktion der Konzentration von LDL im Serum nach SAM-6.10 Behandlung noch stärker.. Diese indirekte Meßmethode muss jedoch im Vergleich zu der in Figur 10 angewandten Methode als ungenauer angesehen werden.

### Patentansprüche

1. Gereinigtes Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, dass
  - die Aminosäuresequenz des Polypeptids im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3, und
  - das Polypeptid low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidiertes LDL (oxLDL), Insbesondere LDL-Cholesterin und/oder oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin), bindet.
2. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bindung des Polypeptides oder der Fragmente des Polypeptids an low density lipoproteins (LDL) und very low density lipoproteins (VLDL), bzw. die jeweils oxidierte Form (oxLDL und (oxVLDL), stärker ist als die Bindung an high density lipoproteins (HDL).
3. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid oder Fragmente des Polypeptids und die im menschlichen und tierischen Körper vorkommenden low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidierten low density lipoproteins (oxLDL) komplementäre Carbohydrat-Strukturen aufweisen.
4. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon ist.

5. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein funktionelles Fragment einer der nachfolgend genannten Gruppen von  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $F_V$ ,  $F_C$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ , und  $F(ab')_2$  ist.
- 5
6. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aminosäuresequenz der variablen Region der leichten Kette ( $V_L$ ) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 1 und/oder die Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette ( $V_H$ ) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 3.
- 10
7. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der leichten Kette ( $V_L$ ) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 2 und/oder die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der schweren Kette ( $V_H$ ) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 4.
- 15
- 20
8. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die genannten Fragmente ein Fragment der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO 1 oder der SEQ ID NO 3 beinhalten.
- 25
- 30

9. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die genannten Fragmente ein Sequenzfragment enthalten, das im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3.

5

10. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1.

10

11. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 3.

15

12. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) of SEQ ID NO 2.

20

13. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) and 295-330 (CDR3) of SEQ ID NO 4.

25

30

14. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 beinhaltet.
- 5 15. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 beinhaltet.
- 10 16. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3 beinhaltet.
- 15 17. Complementarity-determining regions (CDR) oder funktionelle Fragmente davon, welche die Aminosäuresequenzen Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1) oder Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) oder Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) of SEQ ID NO: 1 und/oder Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1) oder Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) oder Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) SEQ ID NO: 3 umfassen.
- 20
- 25 18. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid nach dem in Anspruch 19 beanspruchten Verfahren generierbar ist.
- 30 19. Verfahren zur Generierung eines Antikörpers nach der Hybridomtechnik, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hybridom-Zellen durch Fusion der Heteromyelom-Zellen HAB-1 sowie deren Sub-

klone mit B-Lymphozyten gewonnen werden, welche aus humanen Milzen, Lymphknoten oder Blut entnommen sind.

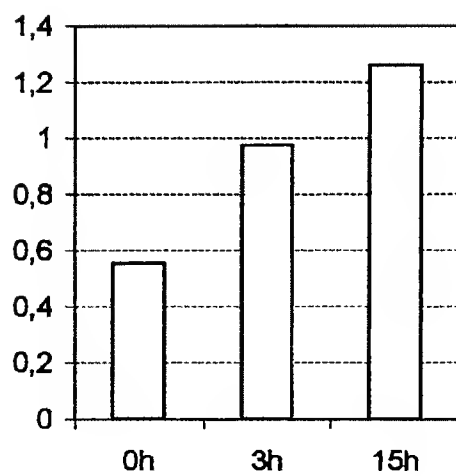
- 5           20. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1, 17 und 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein monoklonaler Antikörper ist.
- 10           21. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein humaner monoklonaler Antikörper ist.
- 15           22. Verwendung eines Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fettsenkender Wirkung.
- 20           23. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidiertem LDL (oxLDL) im Blut.
- 25           24. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von LDL-Cholesterin und/oder oxidiertem LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin).

30

25. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Nierenerkrankungen.

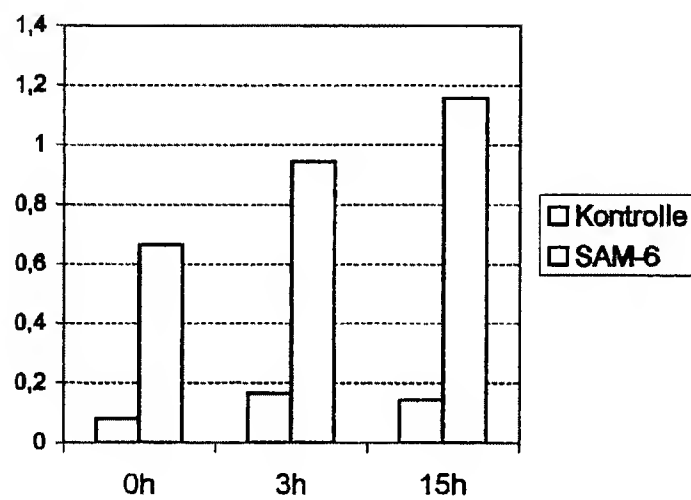
5

26. Verwendung des Polypeptids nach Ansprüche 25 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Glomerulonekrose.

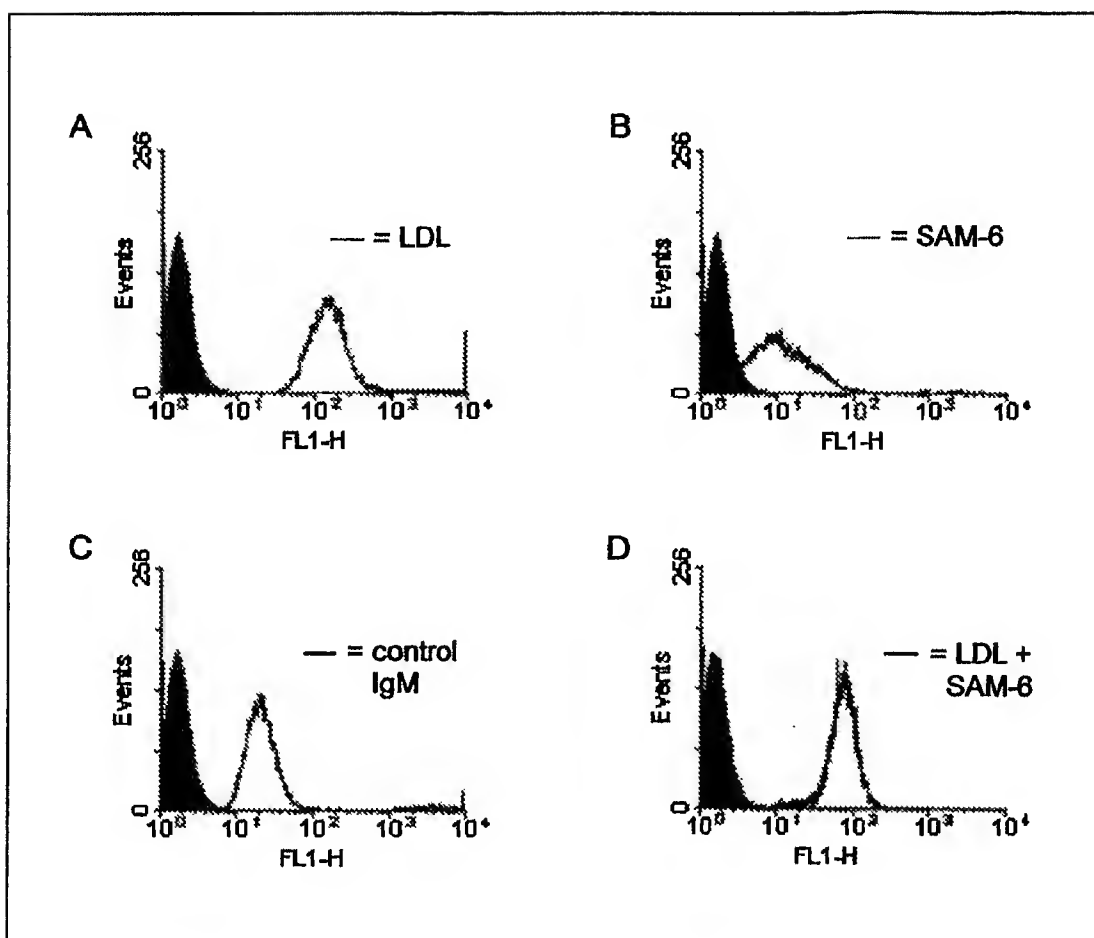


Figur 1

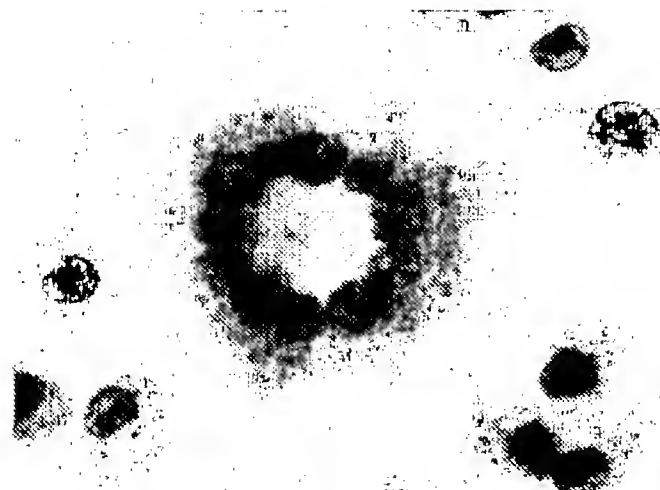




Figur 2

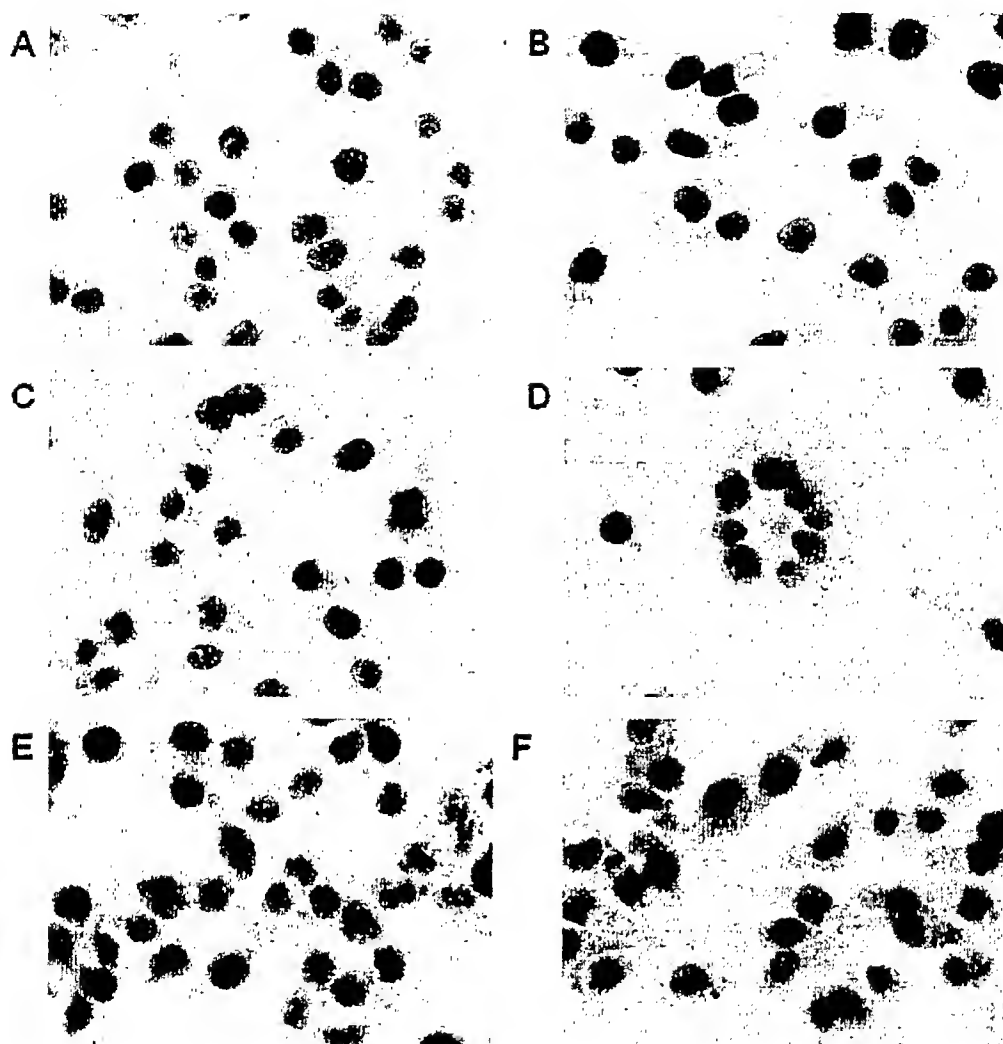


Figur 3



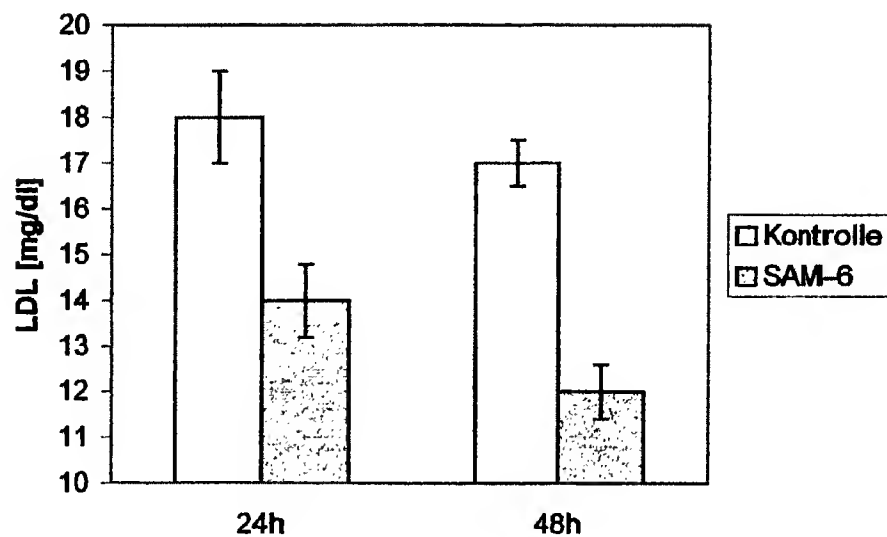
Figur 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

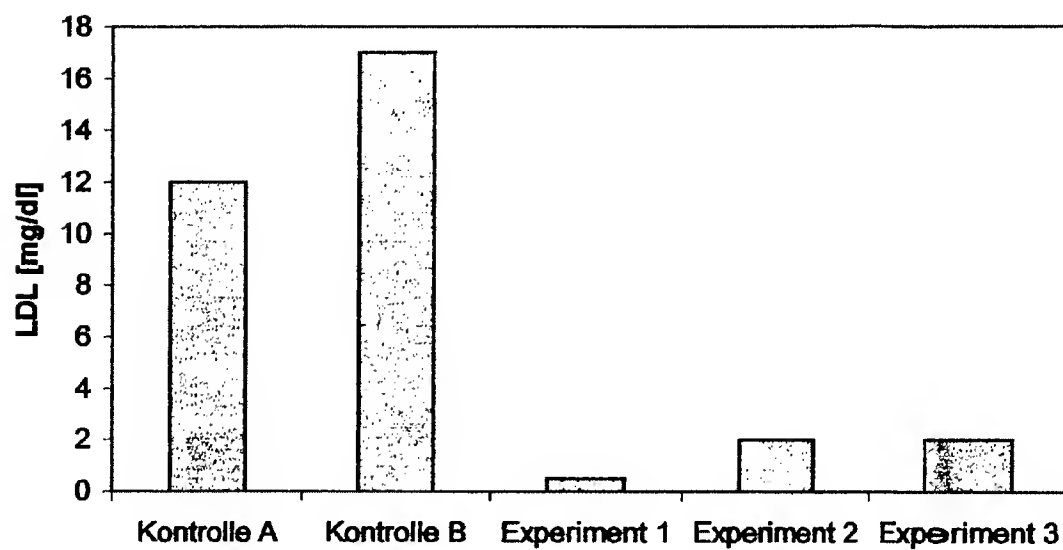


Figur 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)



Figur 6



Figur 7

## Sequence listing

&lt;110&gt; Vollmers, Philip

&lt;120&gt; Human monoclonal antibody

&lt;150&gt; DE-10 353 175.0

&lt;151&gt; 2003-11-14

&lt;160&gt; 4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of the variable region of the light chain (V<sub>L</sub>) of antibody SAM-6

&lt;400&gt; 1

Ser	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5				10					15	

Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys
			20					25					30	

Tyr	Ala	Cys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu
			35					40					45	

Val	Ile	Tyr	Gln	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg
			50					55					60	

Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
			65					70					75	

Gly	Thr	Gln	Ala	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp
			80					85					90	

Asp	Ser	Ser	Ile	Val	Val
			95		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 288

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence of the variable region of the light chain (V<sub>L</sub>) of antibody SAM-6

&lt;400&gt; 2

tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca gga	45
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
CDR1	
cag aca gcc agc atc acc tgc tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa	90
Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys	
20 25 30	
CDR2	
tat gct tgc tgg tat cag cag aag cca ggc cag tcc cct gtg ctg	135
Tyr Ala Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu	
35 40 45	
CDR2	
gtc atc tat caa gat agc aag cgg ccc tca ggg atc cct gag cga	180
Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg	
50 55 60	
CDR2	
ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc agc	225
Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
CDR2	
ggg acc cag gct atg gat gag gct gac tat tac tgt cag gcg tgg	270
Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp	
80 85 90	
CDR3	
gac agc agc att gtg gta	288
Asp Ser Ser Ile Val Val	
95	



&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of the variable region of the heavy chain (V<sub>H</sub>) of antibody SAM-6

&lt;400&gt; 3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15

Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20					25					30

Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45

Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr
				50					55					60

Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65					70					75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Gly
				95					100					105

Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr
				110

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence of the variable region of the heavy chain (V<sub>H</sub>) of antibody SAM-6

&lt;400&gt; 4

cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	45
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	

agg	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	90
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
				20					25					30	

CDR1

agc	tat	gct	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	135
Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	

CDR2

gag	tgg	gtg	gca	ggt	ata	tca	tat	gat	gga	agc	aat	aaa	tac	tac	180
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	
				50					55					60	

gca	gac	tcc	gtg	aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	225
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	
				65					70					75	

aag	aac	acg	ctg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gct	gag	gac	270
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	

CDR3

acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	gat	cgg	tta	gca	gtg	gct	ggt	315
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	
				95					100					105	

aaa	act	ttt	gac	tac											
Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr											
				110											

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
2. Juni 2005 (02.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/049635 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 16/44,  
A61K 39/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/002503

(22) Internationales Anmeldedatum:  
12. November 2004 (12.11.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 53 175.0 14. November 2003 (14.11.2003) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: VOLLMERS, Philip [DE/DE]; Seilerstrasse  
52, 97074 Würzburg (DE).

(74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Röntgenring 4, Postfach 63  
23, 97013 Würzburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CII,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,

FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GI, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 2. Februar 2006

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY HAVING FAT-REDUCING EFFECT

(54) Bezeichnung: HUMANER MONOKLONALER ANTIKÖRPER MIT FETTSENKENDER WIRKUNG

(57) Abstract: The invention relates to a purified polypeptide whose amino acid sequence is substantially identical with the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3, whereby the polypeptide binds low density lipoproteins (LDL) and/or oxidized LDL (oxLDL), especially LDL cholesterol and/or oxidized LDL cholesterol (oxLDL cholesterol). The invention relates to the use of the polypeptide in combination with conventional adjuvants and/or carrier substances for producing a drug having fat-reducing effect and for producing drugs for treating renal diseases.

(57) Zusammenfassung: Aufgereinigtes Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:3, wobei das Polypeptid low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidiertes LDL (oxLDL), insbesondere LDL-Cholesterin und/oder oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin), bindet. Die Erfindung beinhaltet die Verwendung des Polypeptides in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fett senkender Wirkung sowie von Medikamenten zur Behandlung von Nierenerkrankungen.

WO 2005/049635 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE2004/002503

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/44 A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GETZ G S: "The first human monoclonal antibody to oxidized LDL." ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY. AUG 2001, vol. 21, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 1254-1255, XP002333218 ISSN: 1524-4636 the whole document	1-11, 14-17, 20-26
X	-& SHAW PETER X ET AL: "Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo" ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 21, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 1333-1339, XP002333371 ISSN: 1079-5642 the whole document	1-11, 14-17, 20-26
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2005

Date of mailing of the international search report

17.11.2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, A

5

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/048321 A (ALEXION PHARMACEUTICALS) 12 June 2003 (2003-06-12)  figure 3a	1-11, 14-17, 20-26
A	----- EP 0 592 106 A (IMMUNOGEN INC) 13 April 1994 (1994-04-13)  figure 4B; example 1	1-11, 14-17, 20-26
P,X	----- POHLE T ET AL: "Lipoptosis: Tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 64, no. 11, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 3900-3906, XP002324184 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-11, 14-17, 20-26
P,X	----- VOLLMERS H PETER ET AL: "Lipoptosis, tumor-specific cell death via lipid accumulation induced by human monoclonal IgM antibody SAM-6" HUMAN ANTIBODIES, vol. 13, no. 1-2, 2004, page 3, XP009049406 & 11TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN ANTIBODIES AND HYBRIDOMAS; DUBLIN, IRELAND; OCTOBER 06-08, 2004 ISSN: 1093-2607 the whole document -----	1-11, 14-17, 20-26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2004/002503

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **12, 13**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**see supplemental sheet PCT/ISA/210**
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplemental sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
**1-3, 6-11, 14-17 (complete); 4, 5, 18, 20-26 (in part)**

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box II.2

## Claims 12 and 13

Claims 12 and 13 relate to a purified polypeptide, characterised in that it contains nucleic acid sequences which are substantially identical to the CD1-3 of SEQ ID No. 2. This characterisation of the polypeptide makes no sense because polypeptides do not normally contain nucleic acids. It is not clear from the claims what the relationship is between the claimed polypeptides and the nucleic acids specified in the characterising part of the claim. Both claims therefore fail to meet the requirements of clarity (PCT Article 6) and adequate disclosure (PCT Article 5), and consequently both were excluded from the search.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies in cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. However, after entry into the regional phase before the EPO an additional search may be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been corrected.

Continuation of Box III

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-3, 6-11 and 14-17 (all in full); claims 4, 5, 18 and 20-26 (all in part)

A purified polypeptide which is identical with the amino acid sequences of SEQ ID No. 1 and/or SEQ ID No. 2 and binds low-density lipoprotein (LDL) and/or oxidised LDL (oxLDL).

2. Claim 19 (in full); claims 4, 5, 18 and 20-26 (all in part)

An antibody or a functional fragment thereof.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2004/002503

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03048321	A	12-06-2003	AU 2002359568 A1	17-06-2003
			CA 2468744 A1	12-06-2003
			EP 1461428 A2	29-09-2004
			JP 2005511706 T	28-04-2005
-----				
EP 0592106	A	13-04-1994	CA 2105644 A1	10-03-1994
			DE 69333706 D1	30-12-2004
			DK 592106 T3	21-03-2005
			DK 679160 T3	21-03-2005
			ES 2233926 T3	16-06-2005
			HK 1014737 A1	15-07-2005
			JP 7067688 A	14-03-1995
			JP 2005046143 A	24-02-2005
			US 5639641 A	17-06-1997
-----				



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/002503

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK.7 C07K16/44 A61K39/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationsystem und Klassifikationsgebiete)

IPK.7 C07K A61K

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, Sequence Search

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	GETZ G S: "The first human monoclonal antibody to oxidized LDL." ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, AUG 2001, Bd. 21, Nr. 8, August 2001 (2001-08), Seiten 1254-1255, XP002333218 ISSN: 1524-4636 das ganze Dokument	1-11, 14-17, 20-26
X	-& SHAW PETER X ET AL: "Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo" ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, Bd. 21, Nr. 8, August 2001 (2001-08), Seiten 1333-1339, XP002333371 ISSN: 1079-5642 das ganze Dokument	1-11, 14-17, 20-26

—/—

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Staatsdokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"I" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgestellt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. August 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02.11.2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenschönheit

Europäisches Patentamt, P.O. Box 5518 Patentan 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 661 opt nd,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Strobel, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Blatt, Anspruchs Nr.
A	WO 03/048321 A (ALEXION PHARMACEUTICALS) 12. Juni 2003 (2003-06-12)  Abbildung 3a	1-11, 14-17, 20-26
A	EP 0 592 106 A (IMMUNOGEN INC) 13. April 1994 (1994-04-13)  Abbildung 4B; Beispiel 1	1-11, 14-17, 20-26
P,X	POHLE T ET AL: "Lipoptosis: Tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 64, Nr. 11, 1. Juni 2004 (2004-06-01), Seiten 3900-3906, XP002324184 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	1-11, 14-17, 20-26
P,X	VOLLMERS H PETER ET AL: "Lipoptosis, tumor-specific cell death via lipid accumulation induced by human monoclonal IgM antibody SAM-6" HUMAN ANTIBODIES, Bd. 13, Nr. 1-2, 2004, Seite 3, XP009049406 & 11TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN ANTIBODIES AND HYBRIDOMAS; DUBLIN, IRELAND; OCTOBER 06-08, 2004 ISSN: 1093-2607 das ganze Dokument	1-11, 14-17, 20-26

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2004/002503

## Feld II . Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 12,13  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-3, 6-11, 14-17 alle vollständig; 4, 5, 18, 20-26 alle teilweise

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.2

Ansprüche Nr.: 12,13

Ansprüche 12 und 13 betreffen ein gereinigtes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid Nukleinsäuresequenzen enthält, die im wesentlichen mit den CD1-3 der SEQ ID No:2 identisch sind. Diese Charakterisierung des Polypeptids macht keinen Sinn, weil normalerweise ein Polypeptid keine Nukleinsäure enthält. Es ist diesen Ansprüchen nicht zu entnehmen, in welchem Verhältnis die beanspruchten Polypeptide zu den in dem charakterisierenden Teil aufgeführten Nukleinsäuren stehen. Damit erfüllen beide Ansprüche weder die Erfordernisse der Klarheit (Artikel 6 PCT) noch der ausreichenden Offenbarung (Artikel 5 PCT). Sie wurden deshalb gänzlich von der Recherche ausgeschlossen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-3,6-11,14-17 alle vollständig; 4,5,18,20-26 alle teilweise

Ein gereinigtes Polypeptid, das identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID No:1 und/oder SEQ ID No:2 und das Low density lipoprotein (LDL) und/oder oxidiertes LDL (oxLDL) bindet.

---

2. Ansprüche: 19 vollständig; 4,5,18,20-26 alle teilweise

Ein Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon

---

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/002503

in Recherchebericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 03048321	A	12-06-2003	AU	2002359568 A1	17-06-2003
			CA	2468744 A1	12-06-2003
			EP	1461428 A2	29-09-2004
			JP	2005511706 T	28-04-2005
EP 0592106	A	13-04-1994	CA	2105644 A1	10-03-1994
			DE	69333706 D1	30-12-2004
			DK	592106 T3	21-03-2005
			DK	679160 T3	21-03-2005
			ES	2233926 T3	16-06-2005
			HK	1014737 A1	15-07-2005
			JP	7067688 A	14-03-1995
			JP	2005046143 A	24-02-2005
			US	5639641 A	17-06-1997